Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Androgenrezeptorgehalt der Prostata spontan kryptorcher Wistarratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KARIN REGINE HUBICH
aus Reutlingen

1985

UNIV.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546523_0019

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Androgenrezeptorgehalt der Prostata spontan kryptorcher Wistarratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KARIN REGINE HUBICH
aus Reutlingen

1985

Dekan: Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Moeller
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Schieferstein

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Doz. Dr. med. Hans Moeller danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	5
Themenstellung	8
Abkürzungen und Trivialnamen	9
Material und Methoden	
a) Liste der Geräte	10
b) Liste der Chemikalien	10
c) Puffer	11
d) Versuchstiere	12
e) Messung der Radioaktivität	13
f) Proteinbestimmung	13
g) DNA - Bestimmung	14
h) Gewinnung des Cytosols	14
i) Durchführung des Austauschassays	15
j) Berechnung des Rezeptorgehaltes	17
k) Statistische Methoden	19
l) Prinzip des Austauschassays	20
m) Wahl der Inkubationszeit	21
n) Auftrennung in der Agarelektro - phorese nach Wagner (1972)	21
o) Supprimierung der spezifischen Bindung	21
Ergebnisse	23
dazu die Abbildungen 1 - 5	25
Diskussion	30
dazu Abbildung 6	34
Abbildung 7	35
Zusammenfassung	40
Tabellen	41
Literatur	45
Lebenslauf	50

Einleitung

Wistarratten werden in verschiedenen Instituten in Inzucht vermehrt.
Ein Stamm, der in der Tierversuchsanlage der Johann-Wolfgang - Goethe - Universität in Frankfurt a. Main von Gärtner (1969) in strenger Bruder - Schwester - Kreuzung gepaart wurde, zeigte gehäuftes Auftreten eines unilateralen rechts- oder linksseitigen und in geringem Maße auch bilateralen Kryptorchismus. Die dystopen Testes fand man , umgeben vom Pro - cessus vaginalis peritonaei und den bindegewebigen Faszien, im subkutanen Fettgewebe der Bauchhöhle anliegend.
Untersuchungen von Annemarie Flamme (1973) zeigten, daß es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei dieser Form des Kryptorchismus um einen polygenetischen Erbgang handelt.
Odenthal (1972) fand bei Untersuchungen zur Ent - wicklung der hereditär bedingten Hodendystopie dieses Wistar - Rattenstammes, daß es sich in diesem Fall nicht um einen fehlenden Descensus testis handelt, sondern daß hier eine entwicklungs - bedingte, um 180° gedrehte , nach kranial wachsende Anlage des Processus vaginalis vorliegt. Aufgrund der damit verbundenen anatomischen Veränderungen kann der Hoden, der mit dem Processus vaginalis ebenfalls die Drehung um 180° ins subkutane Fett - gewebe vollzieht, nicht normal angelegt werden.
Hellbach (1970) zeigte an Hand von histometrischen Untersuchungen an diesem Tiermaterial, daß das Wachstum der dystopen Testes gegenüber dem der eutopen oder im Vergleich mit den Testes gesunder Kontrolltiere signifikant vermindert war, sobald

die Tiere den Beginn der Geschlechtsreife erreicht hatten. Die morphologischen Befunde seiner histo - metrischen Untersuchungen sprechen für erhebliche Veränderungen im dystopen Hoden. Er fand eine Verkleinerung der Diameter der Tubuli seminiferi in den dystopen Testes um ca. 40 % gegenüber den Diametern in den eutopen Hoden der kranken Tiere.

Interessant sind seine Beobachtungen zur Leydig - zellkerngröße . Bei beginnender Geschlechtsreife entsprechen die Kerndiameter im eutopen Hoden vorübergehend denen der gesunden Kontrollen oder der dystopen Testikel. Mit zunehmendem Alter werden und bleiben die Kerndiameter im eutopen Hoden größer als die der dystopen Hoden oder gesunder Kontrolltiere. Es kann geschlossen werden, daß möglicherweise die Leydigzellfunktion im dys - topen Hoden geschädigt, im eutopen Hoden kom - pensatorisch erhöht ist.

Die Beeinflussung der Androgensynthese durch Kryptorchismus wurde durch Born (1976) untersucht. Er bestimmte die Aktivität der Testosteronbiosyn - these in Homogenaten der Testes. Es ergab sich bei skrotalen Hoden unilateral kryptorcher Tiere eine signifikant höhere Organaktivität als bei abdominalen Hoden sowohl bei reifen als auch bei unreifen Tieren. Die Organaktivität der skrotalen Hoden reifer unilateral kryptorcher Tiere ist signifikant höher als die der Normaltiere.

Die Aktivitätsunterschiede zwischen abdominalen und skrotalen als auch gegenüber den Hoden der Normaltiere sind auf eine durch die Deszensus - störung bedingte geringere Wachstumsrate dieser Organe mit Rückwirkung auf den Gesamtorganismus zurückzuführen und nicht etwa primär auf eine Beeinträchtigung der Enzymausstattung bei genuinem Kryptorchismus.

Collischonn (1969) fand in seiner Arbeit, daß die Aktivität der Testosteronbiosynthese des kryptorchiden gegenüber dem skrotalen Hoden um das 5 - 20 fache geringer ist.
Gärtner (1969) konnte zeigen, daß Messungen der 17 - Ketosteroidausscheidung bei bilateral kryptorchen Ratten eine Reduktion auf zwei Drittel der Ausscheidung normaler Tiere ergeben. Gleichzeitig beobachtet er, daß die Prostatagewichte, die als Indikator des Androgenspiegels im Plasma gelten, bei Tieren mit Hodenretention im Normalbereich liegen.
Da die dystopen Hoden wohl eine Änderung der Androgenstoffwechsellage bedingen, schienen mir die hereditär kryptorchen Wistarratten ein geeignetes Modell zu sein, um Aufschluß über die Beziehungen von Testosteronbiosynthese und Androgenrezeptorbiosynthese zu erhalten.

Themenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Androgenrezeptorgehalt in der Prostata eines hereditär spontan kryptorchen Wistar - Rattenstammes untersucht und mit dem Androgenrezeptorgehalt der Prostata eines gesunden Wistar - Rattenstammes verglichen. Diese Untersuchungen wurden an Wistarratten durchgeführt, die ein Alter von 65 Tagen erreicht hatten, d. h. an jungen, geschlechtsreifen Tieren.

Abkürzungen und Trivialnamen

A	freies, nicht markiertes Androgen
cpm	counts per minute
dpm	Zerfälle pro Minute
DHT	s. Dihydrotestosteron
Dihydrotestosteron	5α-Androstan-3α,17β - diol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Effektivität
K	kryptorche Tiere
*L	freier markierter Ligand
M	mol/ l
Methyltrienolon	s. R 1881
N	normale Tiere
NADase	NAD^+ - Nukleosidase (E.C. 3.2.2.5)
p	Signifikanzniveau
p.a.	pro analysi
pellet	Bodensatz nach dem Zentri - fugieren
R	freier Rezeptor, der keinen Liganden gebunden hat
R 1881 (=Methyltrienolon)	17β-Hydroxy-17α-methyl - oestra -4,9,11-trien-3-on
RA	mit Androgen besetzter Rezeptor
R*L	mit markiertem Liganden besetzter Rezeptor
s	Standardabweichung $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}$
S.A.	spezifische Aktivität
Testosteron	17β-Hydroxy-4-androsten-3-on
Tris	Tris - (hydroxymethyl)amnsio - methan

Material und Methoden

a) Liste der Geräte

- Mikrodismembrator (Braun Melsungen)
- Schüttelbehälter (Braun Melsungen) mit
- Wolfram - Karbid - Kugel ; 10mm Durchmesser
- Ultrazentrifuge Spinco L 2 / 65 mit Rotor 50 Ti; (Beckman Instruments München)
- Gießform, Stanzapparat und Gelschneideapparat für die Gelplatten von Firma Hölzel, Dorfen
- Netzanschlußgerät 121280 (DESAGA Heidelberg)
- Betazählgefäße (Volumen 20ml, Zinsser,Frankfurt)
- Betaszintillationszähler Betaszint BF 5003 A ; (Berthold, Bad Wildbad)
- Oxford - Sampler : 5 µl Mikropipette, Oxford Laboratories, Kontron - Technik GmbH, 8051 Eching -Katalog - Nr. 8505 ; dazu Einweg - Plastikspitzen , Katalog Nr. 809
- Spektralphotometer M4 Q III Carl Zeiss,Oberkochen

b) Liste der Chemikalien

Bezogen von New England Nuclear :

5 α-Dihydrotestosteron-$\left[1,2\text{-}^{3}H\right]$ 143Ci/mmol und R 1881 (Methyltrienolon) nicht markiert.
Wenn die Reinheit der Steroide geringer als 95% war, wurden sie vor Gebrauch durch Dünnschicht - chromatographie gereinigt.

Weitere Chemikalien:

Agar purum (Behring Marburg) ,Reinheitsgrad p.a.
Agarose (Behring Marburg) , Reinheitsgrad p.a.
Unisolve I (Zinsser) , Reinheitsgrad p.a.

Die übrigen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Sie hatten den Reinheitsgrad p.a.

c) Puffer

Tris-Puffer: Tris-hydroxymethyl-aminomethan 0,010 M
Natriumazid 0,005 M
mit 25% HCl bei 4°C auf den pH 7,5 einstellen

DST -Puffer: Dithioerythrit 0,o50 M
Saccharose 0,250 M
NaN_3 0,005 M
Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan 0,010 M
mit HCl bei 4°C auf pH 7,5 einstellen

Michaelispuffer: Natriumdiäthylbarbiturat 0,02 M
Natriumazetat 0,03 M
NaN_3 0,003 M
mit HCl bei 4°C auf pH 8,2 einstellen

d) Versuchstiere

Wistarratten, im Jahre 1927 vom Wistarinstitut abgegeben, wurden in verschiedenen Instituten in Inzuchten vermehrt. Später nach Random - Gesichts - punkten weitergezüchtet, gelangte ein Stamm in die Tierversuchsanlage der Johann -Wolfgang - Goethe Universität in Frankfurt a. Main, wo Gärtner (1969) sie in strenger Bruder - Schwester - Kreuzung paarte. Ein Stamm zeigte gehäuftes Auftreten eines unilateralen rechts - oder linksseitigen und in geringem Maße auch bilateralen Kryptorchismus , wobei der Inguinalkanal von den Testes passiert wurde, ohne daß es zu einem vollständigen Deszensus in die Skrotalhöhle kam.
Wir bezogen die spontan kryptorchen Tiere aus der Tierversuchsanlage der Medizinischen Hochschule Hannover von Professor Gärtner. Die Tiere wurden von uns weitergezüchtet, 30% der männlichen Nachkommen zeigten einen unilateralen Kryptorchis - mus, 70% waren phänotypisch normal. Als Vergleichs - tiere bezogen wir männliche Auszuchtratten des Stammes Wistar von der Firma Ivanovas, Kisslegg. Die Tiere wurden eine Woche vor Eintritt in den Versuch geliefert und bei Trockenfutter (Altromin) und Wasser ad libitum gehalten. Der Raum war von 6 Uhr bis 18 Uhr beleuchtet und nachts dunkel. Im Alter von 65 - 70 Tagen wurden die Tiere am gleichen Tag zwischen 9 und 11 Uhr durch Dekapita - tion getötet. Die Prostaten wurden freipräpariert von Bindegewebe und Fett, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 ° C gelagert.
Die Hoden wurden ebenfalls entnommen und gewogen.

e) Messung der Radioaktivität

Die β - Aktivität wurde mit dem Betaszintillationszähler Betaszint BF 5003 A (Berthold, Bad Wildbad) mit 62% Zählausbeute gemessen.
Es wurde Unisolve I (Zinsser , Frankfurt) als Szintillationsflüssigkeit verwendet.

f) Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Schaffner und Weissmann (1973) - mit der Modifikation von Moeller (1980,1982) - durchgeführt.
Es wurden je 2 x 5 μl der Probe (Cytosol s. h)) auf eine Zelluloseazetatfolie (Membranfolie, Katalog Nr. 11200, Sartorius Göttingen) pipettiert, bei Zimmertemperatur getrocknet und bis zur Analyse gelagert. Die Membranen wurden 10 Minuten in Färbelösung inkubiert (1g Amidoschwarz 10 B , 450 ml Methanol, 100ml Essigsäure , 450 ml H_2O), dann 3 x 3 Minuten in Entfärbelösung gewaschen (900 ml Methanol, 20ml Essigsäure, 80ml H_2O).
Die noch gefärbten Proteinflecken wurden ausgeschnitten und in einem gläsernen Reagenzglas mit je 1ml "Verreißlösung" aufgelöst (100g Trichloressigsäure , 800 ml Ameisensäure, 100ml Essigsäure) . Die Extinktion wurde mit dem Spektralphotometer M4 Q III Carl Zeiss (Oberkochen) bei 620 nm gemessen.
Die Eichkurve für Rinderserumalbumin und menschliches Transferrin ist im Bereich von 1,0 bis 20 μg Protein linear.

g) DNA - Bestimmung

DNA wurde nach der Methode von Burton (1956) bestimmt , jedoch wurde Desoxyribose als Standard genommen. Die Standardkurve ist im Bereich von 2 - 12 µg Desoxyribose linear.

h) Gewinnung des Cytosols

Unter Cytosol verstehen wir den 100 000 g - Überstand eines Gewebe - Puffer - Homogenats .
Es wurden je drei Prostaten kryptorcher Tiere zur Durchführung einer Androgenrezeptorbestimmung nach der Methode von Moeller (1980, 1982) parallel weiterverarbeitet. Das gefrorene Prostatagewebe wurde mit dem Mikrodismembrator in Teflonkapseln nach dem Prinzip der Kugelmühle homogenisiert . Um die Homogenisierung ohne Erwärmung durchzuführen, wurde der dreifache Schüttelvorgang nach je 30 Sekunden unterbrochen, um die Kapseln in flüssigem Stickstoff abzukühlen. Das feine Gewebspulver wurde in gefrorenem Zustand gewogen und durch Zusatz von vier Volumenteilen DST - Puffer pro Gewichtsteil, in dem zuvor 0,08 IU NADase / 100 µl Puffer gelöst worden waren , aufgetaut.
100 µl Suspension wurden für die DNA-Bestimmung abgenommen und eingefroren . Der Rest wurde 60 Minuten bei 100 000 g (40 000rpm im Rotor 50 Ti) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Cytosol mit einer Lumbalkanüle vorsichtig unter der Lipidschicht abgezogen. In dem Röhrchen blieb der Bodensatz und die Lipidschicht.

2 x 5 µl Cytosol wurden zur Proteinbestimmung entnommen, 2 x 100 µl zur Bestimmung des Andro - genrezeptors weiterverarbeitet.

i) Durchführung des Austauschassays

Die Konzentration der Rezeptorbindungsstellen wurde nach der Methode von Wagner 1978 mit den Variationen von Moeller (1980, 1982) bestimmt. Eine Temperatur von 0°- 4°C mußte während der folgenden Versuchsschritte aufrechterhalten werden.

Das Cytosol, der Überstand nach einstündigem Zentrifugieren des Gewebe - Puffer - Homogenats mit 100 000 g , wurde in zwei parallelen Ansätzen mit ^{3}H - DHT inkubiert. Die Ansätze , die hergestellt wurden, haben folgende Zusammen - setzung :

Ansatz 1 :

10 µl Tris - Puffer pH 7,5
10 µl ^{3}H - DHT ; $3 \cdot 10^{-7}$ M
100 µl Cytosol
80 µl DTT - Sucrose - Tris - Puffer pH 7,5

Ansatz 2 :

10 µl R 1881 ; $3 \cdot 10^{-5}$ M
10 µl ^{3}H - DHT ; $3 \cdot 10^{-7}$ M
100 µl Cytosol
80 µl DTT - Sucrose - Tris - Puffer pH 7,5

Ansatz 1 enthielt ^{3}H - DHT ($3 \cdot 10^{-7}$ M) und Ansatz 2 einen zusätzlichen hundertfachen Über - schuß unmarkierten Hormons (R 1881 ; $3 \cdot 10^{-5}$ M). Beide Ansätze wurden 24 Stunden bei 0° - 4°C inkubiert. Während der langen Inkubationszeit wurde ^{3}H - DHT an den Androgenrezeptor gebunden (zur Ausbeute s. Diskussion).

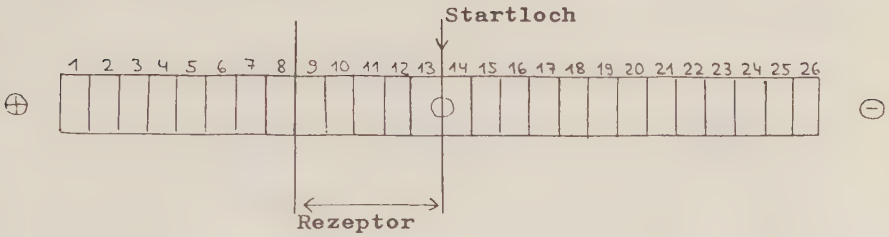
Die Trennung des rezeptorgebundenen Hormons vom unspezifisch gebundenen und freien Hormon erfolgte durch die Agarelektrophorese von Wagner (1972 erstmals angegeben, 1978 in technischen Details beschrieben) .

Auf Glasplatten (100 x 85 x 0,7 mm) wurden Agarplatten (0,81 % Agar purum, 0,9 % Agarose in 0,o5 M Michaelispuffer) in 5 mm Dicke gegos - sen . In die Mittellinie wurden zehn Startlöcher senkrecht zur Feldrichtung zur Aufnahme der Proben gestanzt.

Als Elektrodenpuffer diente 0,1 M Michaelispuffer. Es wurde Filterpapier als Ionenbrücke benutzt. Die Elektrophorese wurde zwei Stunden bei 90 mA pro Agarplatte durchgeführt. Die Temperatur des Agargels blieb durch Kühlung des Kühlblockes mit - 6° C kaltem Isopropanol zwischen 3°und 5° C.

Die einzelnen Gelbahnen wurden nach Beendigung der Elektrophorese zunächst in zehn Längsbahnen parallel zur Feldrichtung und dann in 26 Fraktionen von 3 mm Breite senkrecht zur Feldrichtung geschnit - ten, so daß insgesamt zehn Bahnen zu jeweils 26 Fraktionen entstanden. Die Fraktionen wurden, beginnend auf der anodischen Seite, fortlaufend durchnumeriert. Die überstehenden Ränder wurden verworfen.

Eine der zehn Bahnen sah folgendermaßen aus:



Die einzelnen Gelstücke wurden getrennt in Beta - zählgefäße gegeben und mit 10 ml Unisolve I versetzt. Nach 24 Stunden wurden sie mit dem Betaszintilla - tionszähler Betaszint 5003 A (Berthold , Bad Wildbad) mit 62 % Zählausbeute gemessen.

j) Berechnung des Rezeptorgehaltes

Bei der Auszählung der Aktivität in den einzelnen Fraktionen ergibt sich ein kathodischer und anodischer Peak. Der Androgenrezeptor befindet sich im anodischen Peak (Fraktionen 9 - 13) . Die Radioaktivität, die in den Gelfraktionen 9 - 13 der anodischen Seite des Ansatzes 1 gefunden wurde, wurde A_1 genannt, beim Ansatz 2 entsprechend A_2 . Die Summe der Aktivität der kathodischen Seite und der Aktivität in den Fraktionen 1 - 8 der anodischen Seite wird bei Ansatz 1 B_1 genannt, bei Ansatz 2 entsprechend B_2 .

Der Rezeptorgehalt, der sich als Differenz von Peak A_1 und Peak A_2 ergibt, wird nach Oettling (in Vorbereitung) durch die Formel

$$\triangle \text{ corr} = A_1 - A_2 \cdot \frac{B_1}{B_2}$$

korrigiert.
Die Umrechnung von $\triangle$ corr , das in [cpm] = counts per minute wiedergegeben ist, in die Konzentration (M) erfolgt in mehreren Schritten :

a) Die gemessenen [cpm] = counts per minute müssen zunächst in die tatsächlichen Zerfälle pro Minute [dpm] mit Hilfe der Effektivität E des Zählers (hier E= 0,62) umgerechnet werden :

$$[\text{dpm}] = \frac{[\text{cpm}]}{0,62} \qquad (1)$$

b) Sollen die Zerfälle in Curie (Ci) ausgedrückt werden, so geschieht dies unter Berücksichtigung von:

$$1 \text{ Ci} = 2,2 \cdot 10^{12} \text{ Zerfälle / min}$$

$$1 \text{ Zerfall / min} = \frac{1 \cdot 10^{-12}}{2,2} \text{Ci} = 0,4545 \cdot 10^{-12} \text{ Ci} \qquad (2)$$

c) Da das Volumen V im Startloch nur 50 µl beträgt, muß auf 1l hochgerechnet werden; mit Hilfe der spezifischen Aktivität (S. A.) bekommt man dann die Konzentration:

$$\text{S. A.} = \frac{\text{Zerfälle / min}}{\text{Stoffmenge}} = \frac{\text{Zerfälle / min}}{\text{conc} \cdot \text{V}}$$

$$\text{conc} = \frac{\text{Zerfälle / min}}{\text{S. A.} \cdot \text{V}} \qquad (3)$$

(1) und (2) in (3):

$$\text{conc} = \frac{[\text{cpm}]}{0,62} \cdot \frac{0,4545 \cdot 10^{-9}}{\text{V}(\mu\text{l}) \cdot \text{S. A.}(\text{Ci/mmol})} \quad \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

In unserem Fall lautet die Formel :

$$\text{conc} = \frac{[\text{cpm}]}{0{,}62} \cdot \frac{0{,}4545 \cdot 10^{-12}\ \text{Ci}}{50\,\mu\text{l} \cdot 143\ \text{Ci/mmol}}$$

$$= \frac{[\text{cpm}]}{0{,}62} \cdot \frac{0{,}4545 \cdot 10^{-9}}{50 \cdot 143} \quad \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

allgemein:

$$\text{conc} = \frac{[\text{cpm}]}{E} \cdot \frac{0{,}4545 \cdot 10^{-9}}{V(\mu\text{l}) \cdot \text{S.A.(Ci/mmol)}} \quad \text{M}$$

wobei E die Effektivität darstellt, V das Volumen(μl) im Startloch wiedergeben soll und S.A. der spezi - fischen Aktivität (Ci/mmol) des verwendeten radio - aktiv markierten Hormons gleichkommt.
Die gefundene Rezeptorkonzentration entspricht der Konzentration im Ansatz ; die Konzentration im Cytosol ist genau doppelt so hoch (s. Zusam - mensetzung des Ansatzes i)).

k) Statistische Methoden

Mit Hilfe des Tischcomputers 9810 A Calculator Hewlett Packard wurden die Signifikanzberechnungen mit dem zweiseitigen t -Test und dem gepaarten t - Test durchgeführt ; p wurde nach Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen(1977) bestimmt. Bei unterschiedlicher Varianz wurde das Näherungs - verfahren von Welch (1937) angewandt .

1) Prinzip des Austauschassays

Markierung:

Dem aufbereiteten Gewebe wird ein markierter Ligand $^*L$ zugegeben, der

1.) sich in einer Assoziationsreaktion mit dem freien Rezeptor R verbindet

$$R + {}^*L \rightleftharpoons R^*L$$

2.) in einer Austauschreaktion nach Langzeitinkubation sich mit dem Rezeptor RA verbindet, der zunächst durch nicht markiertes Androgen A besetzt war.
Es ist notwendig, $^*L$ in einer Konzentration (10^{-8} M) zuzugeben, die dem hundertfachen Wert der Dissoziationskonstanten K_D ($\approx 10^{-10}$ M) entspricht, um 99% der Rezeptoren zu besetzen.
Stark vereinfacht dargestellt bedeutet das:

$$RA \rightleftharpoons R + A$$
$$R + {}^*L \rightleftharpoons R^*L$$

Da die Umbesetzung nicht vollständig ist, liegen am Ende neben R^*L und freiem Androgen auch noch in geringem Maß freier Rezeptor und freies $^*L$, das gemeinsam mit dem unspezifisch gebundenen $^*L$ die Messung des markierten Rezeptors beeinträchtigt, vor.

Daraus ergibt sich der nächste Schritt.

Separierung:

Der R^*L - Komplex muß vom unspezifisch gebundenen Liganden $^*L$ und vom freien $^*L$ getrennt und gemessen werden.
Dies erfolgt durch die Agarelektrophorese von Wagner (1972 erstmals angegeben, 1978 in technischen Details beschrieben) - s. Versuchsschritt i) bzw. Erläuterung in n) .
Eine Korrektur erfolgt durch die Supprimierung der spezifischen Bindung (s. o)) .

m) Wahl der Inkubationszeit

Die Entscheidung für eine Inkubationszeit von 24 Stunden ist ein Kompromiß, der sich aus dem Wunsch nach einer langen Inkubation aufgrund der langsamen Umbesetzung des Rezeptors einerseits und der Not - wendigkeit einer schnellen Inkubation aufgrund von Degradierungsreaktionen ergibt (s. Diskussion). ^{3}H - DHT wird während der langen Inkubationszeit nur in geringem Prozentsatz verstoffwechselt, da das Cytosol NADase enthält, die im Versuchsschritt h) zugefügt worden war und die Metabolisierung verhindert (Moeller 1982) .

n) Auftrennung in der Agarelektrophorese nach Wagner (1972)

Der größte Teil unspezifisch gebundener Liganden wandert zur Kathode, und auch die ungebundenen Li - ganden werden durch den endosmotischen Pufferstrom in Richtung Kathode gespült, während die an die Andro- genrezeptoren gebundenen Liganden zur Anode wandern. Allerdings erfolgt die Abtrennung nicht vollständig. Daher sind weitere Maßnahmen zur Unterscheidung der Bindungsarten notwendig .

o) Supprimierung der spezifischen Bindung

Man nutzt die Tatsache, daß die Konzentration der Rezeptorbindungsstellen klein ist ("low capacity", aber "high affinity") gegen die der unspezifischen Bindungsstellen ("high capacity", "low affinity"). Parallel zu Inkubationsansatz 1 macht man einen An - satz 2, der außer den markierenden radioaktiven Ligan- den noch unmarkierten Liganden R 1881 in hundertfachem Überschuß enthält. Im Ansatz 2 ist die Bindung des radioaktiven ^{3}H -DHT an den Rezeptor auf 1 % im Ver- gleich zum Ansatz 1 herunterverdünnt.

Die unspezifische Bindung ist aufgrund der Eigenschaften " high capacity " und "low affinity " unbeeinträchtigt. Im Ansatz 1 mißt man unspezifische Bindung, freie Liganden und spezifische Bindung, im supprimierten Ansatz 2 nur unspezifische Bindung und freie Liganden (jeweils in den Gelfraktionen 9 - 13). Die Differenz, die "supprimierte " Bindung , wird als die spezifische Bindung des radioaktiven Liganden im Ansatz 1 angesehen.

Wir verwendeten zur Supprimierung bewußt R 1881 und nicht DHT , um aufgrund gleicher Dihydrotestosteronkonzentrationen im Ansatz 1 und 2 parallele Verhältnisse hinsichtlich Verstoffwechslung und Degradierung zu ermöglichen; das nicht markierte DHT würde mit dem Stoffwechsel des ^{3}H - DHT interferieren .

Ergebnisse

Das Durchschnittsgewicht der Prostata des kryptorchen Stammes betrug 182,6 ± 37,1 mg, des normalen Stammes 119 ± 16,9 mg . Der Unterschied ist signifikant ($p = 0{,}001$). Die krankhaft veranlagten Tiere haben ein um den Faktor 1,53 erhöhtes Prostata - gewicht.

Die Gesamtrezeptormenge in der ganzen Prostata ist bei den kryptorchen Tieren gegenüber den normalen um den Faktor 3,25 erhöht ($\bar{x}_{kryptorch} = 130 \pm 49$ fmol/ Prostata ; $\bar{x}_{normal} = 40 \pm 20$ fmol / Prostata). Der Unterschied ist signifikant ($p = 0{,}001$).

Wenn man die Rezeptormenge auf mg Prostata bezieht, beträgt der Faktor noch 2,1 ($\bar{x}_K = 0{,}702 \pm 0{,}184$fmol/mg, $\bar{x}_{normal} = 0{,}336 \pm 0{,}158$ fmol/mg). Es besteht Signifi - kanz ($p = 0{,}001$).

Bei den Werten Rezeptormenge/mg Protein ist der Durchschnittswert der kryptorchen Tiere um den Faktor 2,0 höher als der der normalen Tiere ($\bar{x}_{kryptorch} = 55{,}7 \pm 17{,}9$ fmol/mg ; $\bar{x}_{normal} = 27{,}5 \pm 19{,}9$ fmol/mg). Der Unterschied ist signifikant ($p=0{,}001$).

Um auch eine Aussage über die Rezeptormenge pro Zelle zu erhalten, wurde die Rezeptorkonzentration auf die nucleäre DNA-Menge bezogen (fmol/mg DNA). Hier war der Durchschnittswert des kryptorchen Stammes gegenüber dem der normalen Tiere um den Faktor 1,97 erhöht ($\bar{x}_{kryptorch} = 242 \pm 94$ fmol/mg ; $\bar{x}_{normal} = 123 \pm 69$ fmol/mg). Der Unterschied ist signifikant ($p=0{,}001$) .

Der Proteingehalt der Prostaten zeigte keinen

signifikanten Unterschied ($\bar{x}_{kryptorch}$=13,15±2,04µg/mg; $\bar{x}_{normal}$= 14,27 ± 4,51µg/mg , p=0,40).

Der DNA - Gehalt der Prostaten war ebenso nicht signifikant unterschiedlich ($\bar{x}_{krypt.}$=3,03± 0,50µg/mg; $\bar{x}_{normal}$= 2,85 ± 0,49µg/mg , p = 0,40).

Die Hodengewichte waren auffallend unterschiedlich. Das Durchschnittsgewicht des Hodens der normalen Tiere betrug 1,31 ± 0,191 g .

Bei den einseitig kryptorchen Tieren mußte zwischen den dystopen, nicht deszendierten Hoden ($\bar{x}$ = 0,654 ± 0,164 g) und den eutopen, deszendierten Hoden ($\bar{x}$ = 1,762 ± 0,165 g) unterschieden werden. Sowohl bei der Austestung von eutopen gegen dystopen Hoden als auch bei dem Vergleich von eutopen mit normalem Hoden und von dystopem Hoden mit normalem Hoden ergab sich ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$.

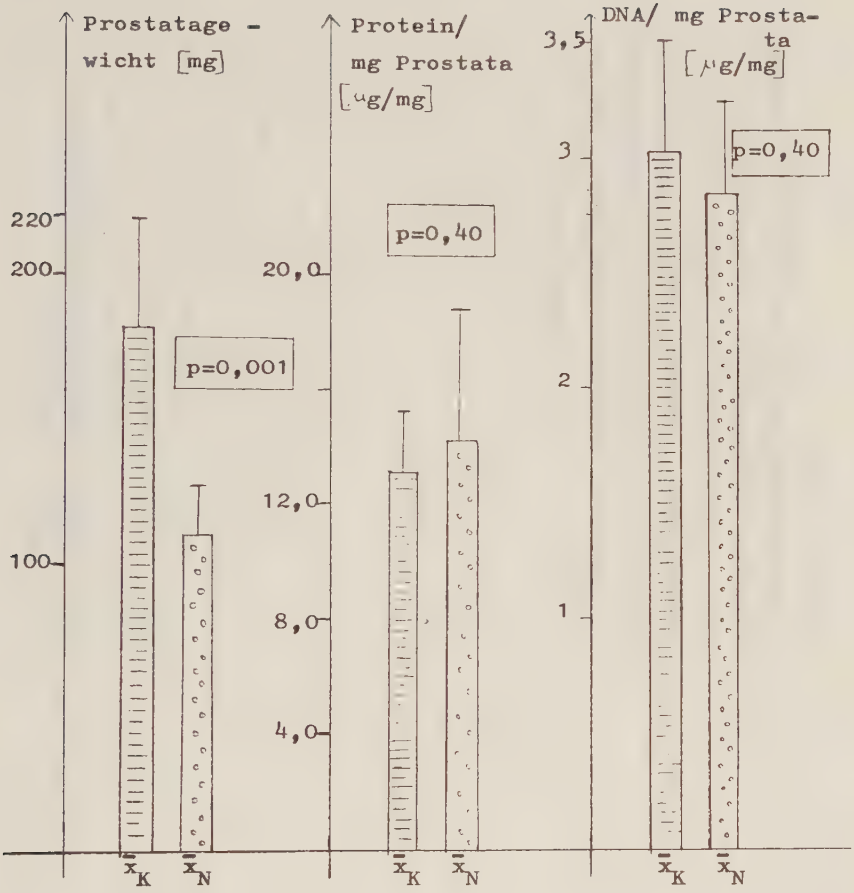


Abbildung 1 :

Prostatagewicht [mg] , Proteingehalt der Prostata [µg/mg] und DNA -Gehalt der Prostata [µg/mg] von kryptorchen Tieren (K) und normalen Tieren (N) .

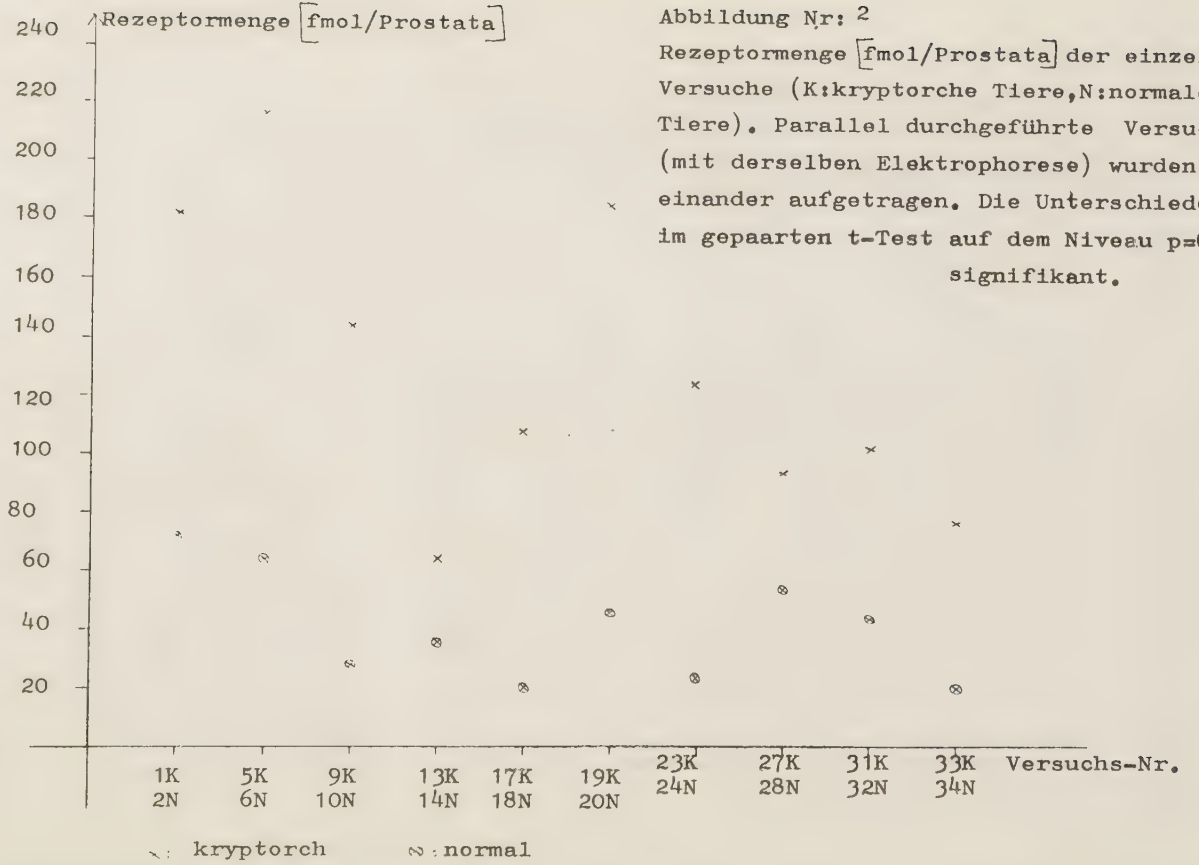


Abbildung Nr: 2
Rezeptormenge [fmol/Prostata] der einzelnen Versuche (K:kryptorche Tiere,N:normale Tiere). Parallel durchgeführte Versuche (mit derselben Elektrophorese) wurden übereinander aufgetragen. Die Unterschiede sind im gepaarten t-Test auf dem Niveau p=0,001 signifikant.

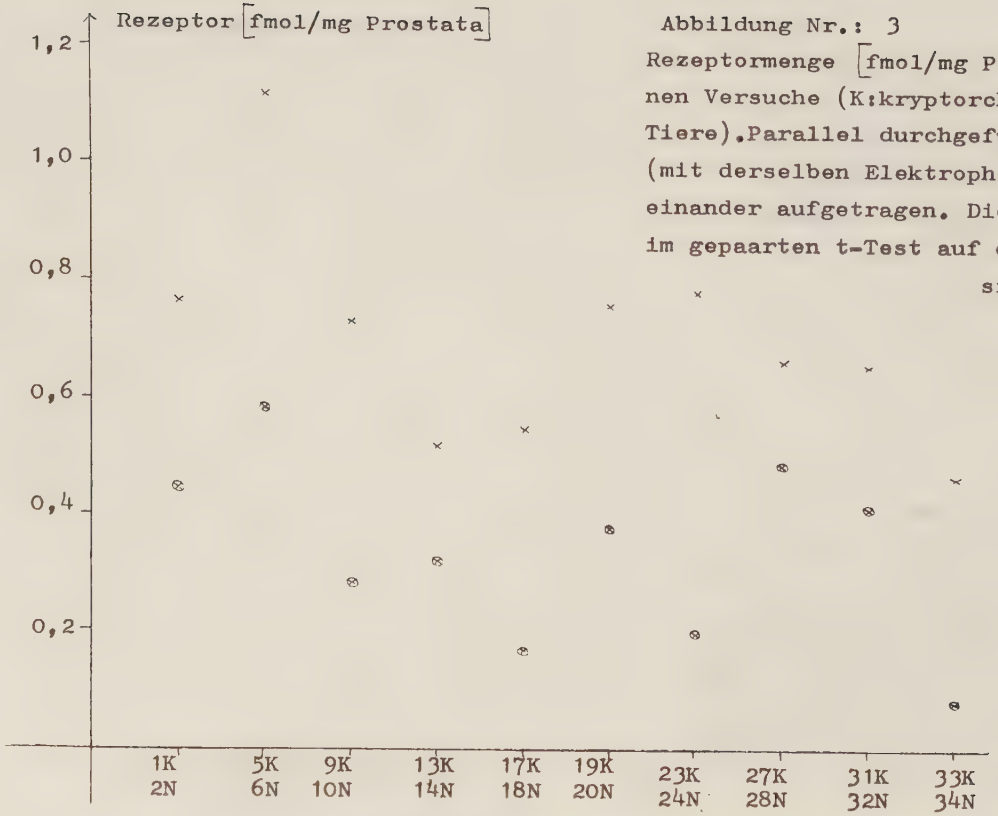


Abbildung Nr.: 3

Rezeptormenge [fmol/mg Prostata] der einzelnen Versuche (K:kryptorche Tiere,N:normale Tiere).Parallel durchgeführte Versuche (mit derselben Elektrophorese) wurden übereinander aufgetragen. Die Unterschiede sind im gepaarten t-Test auf dem Niveau p=0,001 signifikant.

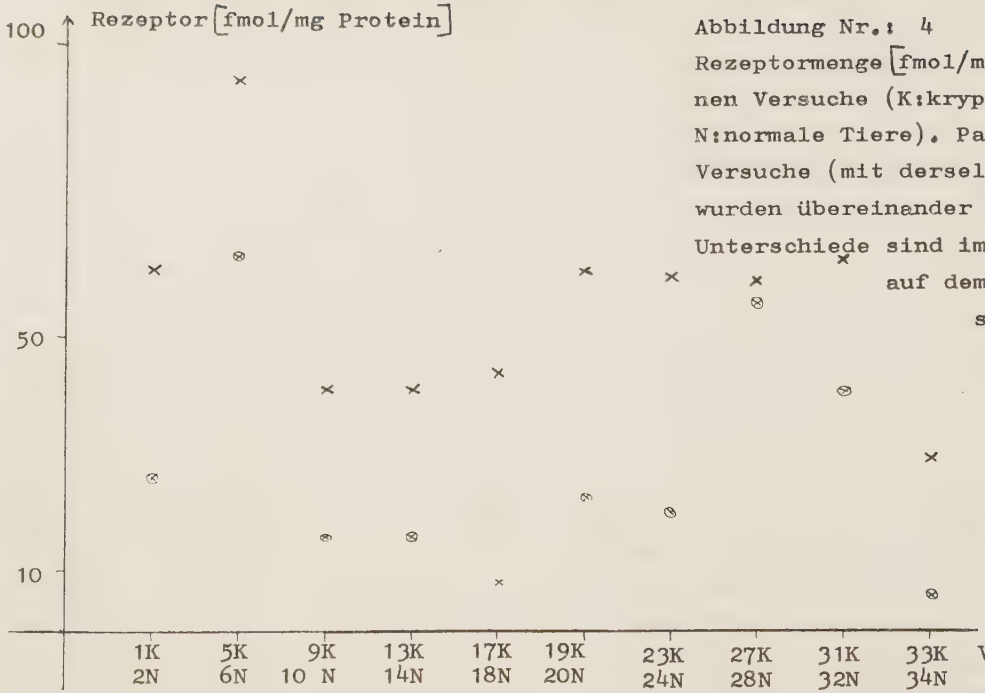


Abbildung Nr.: 4
Rezeptormenge [fmol/mg Protein] der einzelnen Versuche (K:kryptorche Tiere, N:normale Tiere). Parallel durchgeführte Versuche (mit derselben Elektrophorese) wurden übereinander aufgetragen. Die Unterschiede sind im gepaarten t-Test auf dem Niveau p=0,001 signifikant.

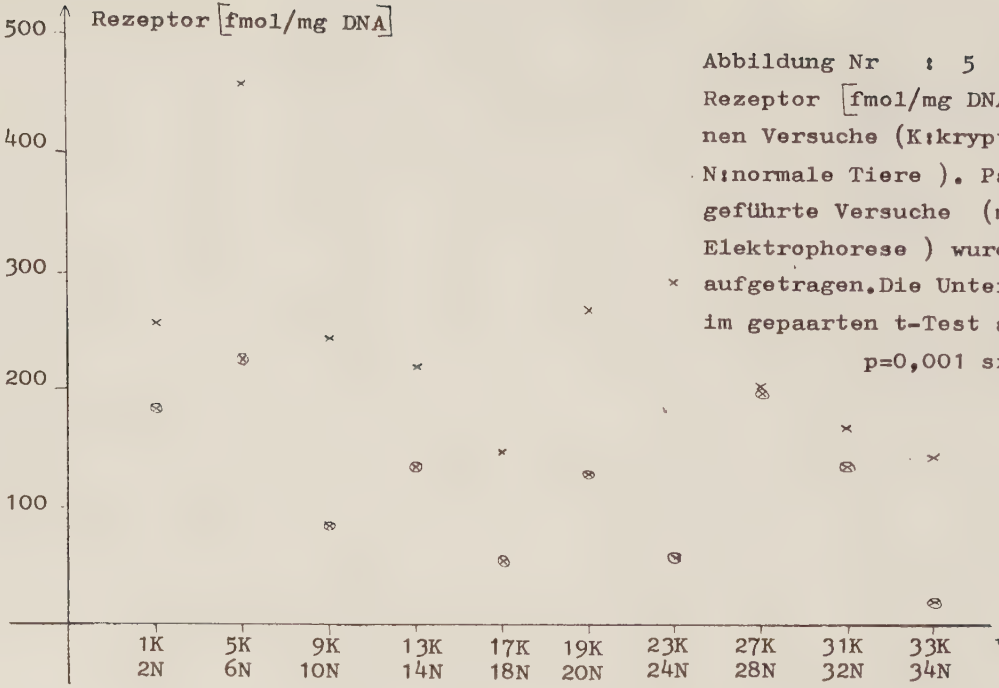


Abbildung Nr : 5
Rezeptor [fmol/mg DNA] der einzelnen Versuche (K:kryptorche Tiere; N:normale Tiere). Parallel durchgeführte Versuche (mit derselben Elektrophorese) wurden übereinander aufgetragen. Die Unterschiede sind im gepaarten t-Test auf dem Niveau p=0,001 signifikant .

Über die Auswirkungen von Deszensusstörungen der Testes bei verschiedenen Spezies ist eine große Anzahl von Untersuchungen durchgeführt worden.
Während über Schädigungen der Spermatogenese bei kryptorchen Hoden kein Zweifel besteht (referiert von Bierich 1980), ist die Frage nicht geklärt, ob weitere Änderungen in den klassischen androgenabhängigen Organen vorliegen.
In dieser Arbeit wird versucht , Aufschluß darüber zu gewinnen, ob sich der Androgenrezeptorgehalt der Prostata als Indikator eines veränderten Hormonhaushaltes beim Kryptorchismus erniedrigt oder erhöht.
Zunächst beschäftigte uns das Problem einer sinnvollen Methode :
1.) Die Androgenrezeptoren liegen unter physiologischen Bedingungen in der Prostata teils frei und teils durch Hormon besetzt vor. Nur freie Rezeptoren finden wir in der Prostata von Ratten, die 24 Stunden vorher orchidektomiert wurden. Da hier jedoch nicht mehr von physiologischen Bedingungen gesprochen werden kann - bereits eine Woche nach der Orchidektomie sind überhaupt keine Rezeptoren mehr nachweisbar - ist die Untersuchung der Prostata der nicht orchidektomierten Ratte vorzuziehen. Ganz abgesehen davon muß bei der Entwicklung des Verfahrens bedacht werden, daß bei Entnahme von menschlichem Gewebe keine vorangehende Orchidektomie möglich ist.
Daher muß zur Untersuchung der Androgenrezeptoren ein Verfahren verwendet werden, das sowohl freie Rezeptoren als auch besetzte Rezeptoren mißt.

Bereits 1973 hat John A. Katzenellenbogen in seinen Studien über den Östrogenrezeptor im Uterus von Ratten über die Verwendung des Austauschassays berichtet. Vereinfacht dargestellt, sollen im Austauschassay folgende Vorgänge ablaufen :
Ein radioaktiv markierter Ligand wird dem aufbereiteten Gewebe zugegeben. Dieser Ligand soll sich
a) in einer Assoziationsreaktion mit dem freien Rezeptor verbinden
b) in einer Austauschreaktion nach Langzeitinkubation sich mit dem Rezeptor verbinden, der zuvor besetzt war. Dabei wird der unmarkierte Ligand A gegen den markierten Ligand *L ausgetauscht. Der mit unmarkiertem Androgen besetzte Rezeptor RA wandelt sich in einen erkennbaren, radioaktiv besetzten Rezeptor R*L um.

2.) Forderungen, die an das Verfahren gestellt werden müssen :

a) Es wird ein reliables, d.h. reproduzierbares Verfahren benötigt.
b) Das Verfahren muß valide sein, d.h. es muß gesichert sein, daß tatsächlich die gewünschten Rezeptoren gemessen werden.
c) Zur Beurteilung der Ergebnisse müssen Kinetiken über Assoziation, Dissoziation und Degradierung aufgestellt werden.

3.) Durchführung am Beispiel des verwendeten Verfahrens

Ich möchte am Beispiel der Methode (Moeller 1982), die in unserem Labor verwendet wird, zeigen, wie man zu der Beurteilung der Leistungsfähigkeit eines Assays kommt. Die Punkte a) und b) der oben genannten Bedingungen wurden in zahlreichen Versuchen hinreichend überprüft (Moeller 1982) .

Die Stabilität der Reaktionspartner warf einige Probleme auf. Der natürliche Ligand des Androgenrezeptors, das Dihydrotestosteron, wird im Prostatacytosol einer schnellen Konversion unterworfen und außerdem in hohem Maße unspezifisch an Proteine gebunden. Deshalb sind viele Autoren den Weg über das synthetische Methyltrienolon (R 1881) gegangen (mit Ausnahme von Moeller 1980, 1982).

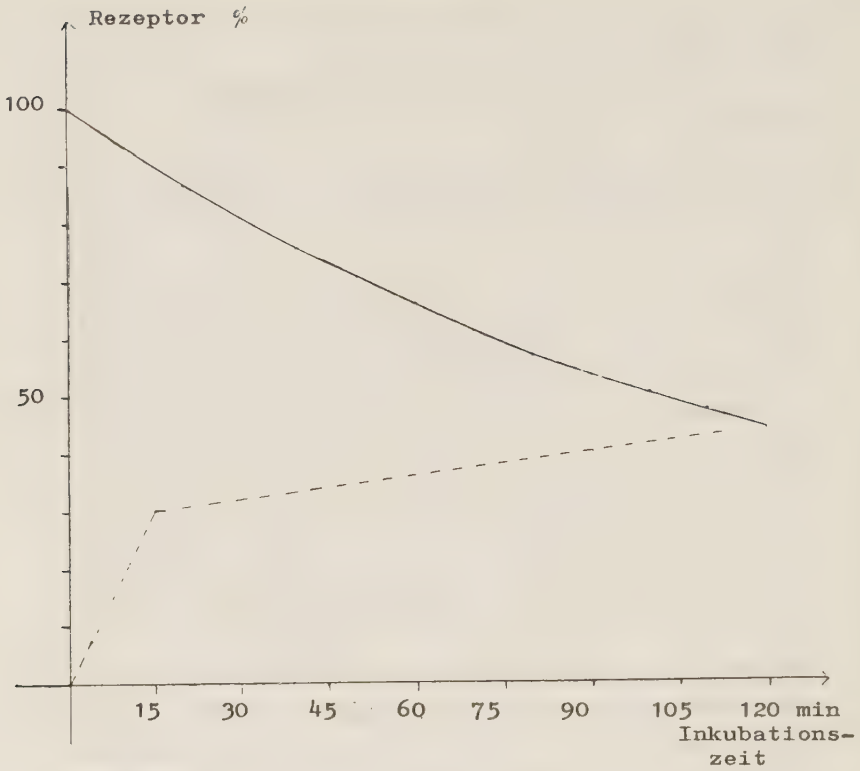
Irrtümlicherweise wurde allgemein angenommen, daß R 1881 eine höhere Assoziationskonstante habe als der natürliche Ligand Dihydrotestosteron. Diese Feststellungen wurden in Versuchen gemacht, in denen die schnelle Metabolisierung des Dihydrotestosteron nicht verhindert wurde (Bonne und Raynaud, 1976) .

In dem von Moeller entwickelten Verfahren wurde die Verstoffwechslung des ^{3}H - DHT durch Zugabe von NAD^{+} -Nukleosidase (0,08 I U / 100 μl Puffer bzw. 0,32 I U / ml Inkubat) unterdrückt. Dadurch verlor R 1881 seinen scheinbaren Vorzug gegenüber Dihydrotestosteron, es zeigte sich eine höhere Assoziationskonstante des ^{3}H -DHT (Moeller u.a. ,1983) . Auch die Unspezifität des R 1881, das nicht nur von Androgen- , sondern auch von Progestinrezeptoren gebunden wird, spricht für eine Verwendung des ^{3}H- DHT.

Wir verwendeten R 1881 nur zur Suppression in Ansatz 2, um in beiden Ansätzen gleiche ^{3}H - DHT - Mengen und einen vergleichbaren ^{3}H - DHT - Stoffwechsel zu erhalten (s. Material und Methoden ; o) Supprimierung).

Durch die Arbeit mit dem supprimierten Ansatz, in dem die unspezifische Bindungskapazität und die freien, markierten Liganden erkennbar wurden, und dem nicht supprimierten Ansatz, in dem die totale Bindungskapazität dargestellt wird, wurde die spezifische Bindung an den Rezeptor als verbleibende Differenz zu einer erfaßbaren Größe.

Unter diesen Voraussetzungen konnte ^{3}H-DHT als markierender Ligand verwendet werden.
Nun mußten geeignete Inkubationsbedingungen gefunden werden.
Wie ich im Punkt 2c bereits erwähnt habe, spielen die Kinetiken bei der Beurteilung des Austauschassays eine wichtige Rolle.
Um die Darstellung zu vereinfachen, sind in Abbildung 3 die besetzten Rezeptoren zunächst unberücksichtigt geblieben. Der freie Rezeptor hat bei 2°C eine Halbwertszeit von 100 Minuten (Oettling, in Vorbereitung). Das bedeutet, daß der freie Rezeptor bis zur Absättigung mit dem radioaktiven Liganden einer erheblichen Degradierung unterliegt. Nach der Absättigung ist er wesentlich stabiler und wird mit einer Halbwertszeit von 170 Stunden abgebaut (Oettling , in Vorbereitung) .
Abbildungen 6 und 7 (s. Seite 34 und 35) sollen darstellen, wie man sich nach bisherigen Untersuchungen und Berechnungen die Assoziations- , Dissoziations- und Degradierungskinetiken von freiem und besetztem Rezeptor vorstellt (Moeller, 1982 ; Oettling, in Vorbereitung).
In Abbildung 6 , in der zunächst der freie Rezeptor betrachtet wird, läuft die Degradierung so schnell ab, daß durch die Assoziation nur ein Teil abgefangen werden kann.
Abbildung 7 entspricht den Ausgangsbedingungen unserer Versuche , bei denen anfangs fast nur besetzter Rezeptor vorliegt, der seinen natürlichen Liganden gegen das markierende, meßbare ^{3}H-DHT austauschen soll.



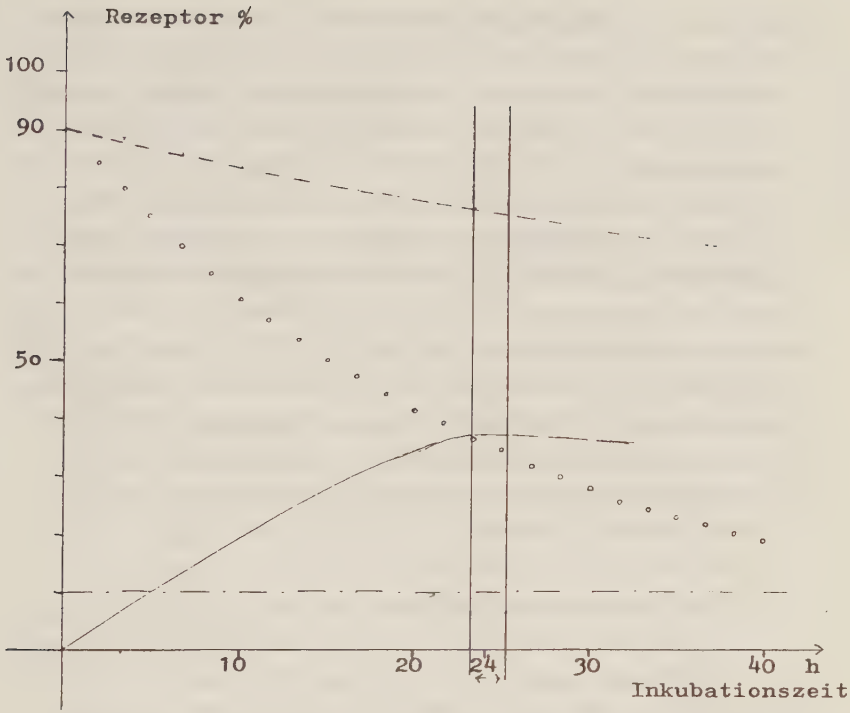
Legende:

———————— freier Rezeptor

- - - - - - - - - mit markiertem Liganden besetzter Rezeptor

Abbildung Nr. 6

Degradierung des freien Rezeptors (durchgezogene Linie) bei einer Halbwertszeit von 100 Minuten (Oettling , in Vorbereitung) und Assoziationskinetik von ^{3}H - DHT an den freien Androgenrezeptor (Moeller , 1982) . Inkubation bei 0 ° bis 2 ° C.



Legende:

— — — — mit unmarkiertem Androgen besetzter Rezeptor, Degradierung

° ° ° ° ° ° ° ° Dissoziation des besetzten Rezeptors

— · — · — freier Rezeptor

——————— meßbarer , markierter Rezeptor

Abbildung 7

Degradierungs- und Austauschreaktionen nach Zugabe von ^{3}H-DHT ($3 \cdot 10^{-7}$ M) zu besetztem Rezeptor ; Inkubation bei 0 ° bis 2 ° C.
Schematische Darstellung entsprechend den von Oettling (in Vorbereitung) angegebenen Halbwertszeiten.

Wenn man die Rezeptoren betrachtet, die zunächst mit unmarkiertem Androgen besetzt sind, so ergibt sich aufgrund des langsamen Austausches die Notwendigkeit einer längeren Inkubationszeit als bei den freien Rezeptoren .
Man kann in Abbildung 7 deutlich ablesen, daß eine Inkubation, die länger als 24 Stunden anhält, nicht sinnvoll ist, da trotz der von uns gewählten niedrigen Inkubationstemperatur von 0°C bis 2°C die Degradierung hier bereits überwiegt.
Andere Autoren berichten über Inkubationen bei höheren Temperaturen (15°C, 20°C ; Bonne, Raynaud 1976). Entsprechende Versuche gingen in unserem Labor mit totalem Rezeptorverlust einher, wenn länger als eine Stunde inkubiert wurde.

Es muß also folgendes beachtet werden:

1.) Die Reaktionen zwischen dem Androgen - rezeptor und DHT bzw. R1881 folgen nicht der gleichen Kinetik. DHT hat eine höhere Assoziationskonstante (Moeller u.a. , 1983) und eine gesicherte Spezifität.
2.) Die Assoziation zwischen freiem DHT-Rezeptor und DHT bzw. R1881 dauert ungefähr eine Stunde (Oettling, in Vorbereitung).
3.) Der cytoplasmatische DHT-Rezeptorkomplex der Rattenprostata dissoziiert in unserem System in einer Reaktion I. Ordnung , Halbwertszeit 18 Stunden (Oettling, in Vorbereitung) .
4.) Der freie DHT - Rezeptor wird in unserem System in einer Reaktion I. Ordnung mit der Halbwertszeit von 100 Minuten zerstört (Oettling, in Vorbereitung).
5.) Der DHT- Rezeptorkomplex wird in unseren Systemen in einer Reaktion I. Ordnung mit der Halbwertszeit von 170 Stunden zerstört (Oettling, in Vorbereitung).

Für unser Versuchssystem wird daraus geschlossen:

Nach 24h -Inkubation sind ca. 60 - 70 % des be - setzten Rezeptors dissoziiert. Davon sind 20 % degradiert, so daß ca. 40 % verbleiben. Schwer erfaßbar ist der Anteil an freien Rezeptoren, die bei den Dissoziationsreaktionen vorübergehend vorliegen und erheblich schneller zerstört werden. Zusätzlich muß ein Verlust während der Elektrophorese berücksichtigt werden. Neuere Untersuchungen von Oettling zeigen, daß in diesem Austausch - assay etwa 30 - 40% der ursprünglich vorhandenen Rezeptoren erfaßt werden (Oettling,in Vorbereitung).

Der Austauschassay ist ein reliables Verfahren, aber es ergibt sich nur eine geringe Ausbeute. Da in dieser Arbeit der relative Vergleich kranker und gesunder Tiere von zentraler Bedeutung ist, weniger die absoluten Werte, kann die geringe Ausbeute vernachlässigt werden, solange der dadurch enstehende Fehler bei beiden Tierarten gleich ist. Entscheidend ist die Spezifität und Relia - bilität des Verfahrens.

Wenn man die Ergebnisse betrachtet, so erstaunt es, daß bereits beim Prostatagewicht ein signifikanter Unterschied festzustellen ist.
Hellbach (1970) hat in seinen Untersuchungen an Ratten mit hereditär bedingter unilateraler Des - zensusstörung keine Gewichtsunterschiede fest - stellen können, hat jedoch als Vergleichstiere Tiere desselben kryptorchen Stammes, bei denen die Anlage nicht phänotypisch zur Ausprägung gekommen war, verwndet, während wir bei unseren Untersuchungen als Kontrolltiere einen gesunden Wistarstamm gebrauchten.

Wie kann es zu einer Hypertrophie der Prostata und gleichzeitiger Überproduktion an Androgenrezeptoren kommen ?

In den dystopen Hoden des spontan kryptorchen Rattenstammes wurde eine Tubuluswandverdickung beobachtet (Krause 1971). Krause vermutet eine dadurch bedingte Behinderung des Durchtritts von Testosteron ins Keimepithel. Reaktiv könnte eine Überproduktion von Testosteron ausgelöst werden. Die Veränderung des Hormonspiegels von Testosteron oder eines anderen, damit in Verbindung stehenden Stoffes könnte durch seinen Einfluß auf Prostata - größe und Androgenrezeptorgehalt Vorgänge aus - lösen, die zu der beobachteten Erhöhung des Rezep - torgehaltes führen (andere wissenschaftliche Untersuchungen zur Veränderung der Testosteron - produktion wurden in der Einleitung erwähnt) .

Es wird immer noch davon ausgegangen, daß entsprechend der Lehrmeinung der Androgenrezeptor- gehalt der Prostata durch das Testosteron bestimmt wird. So haben z.B. alte Tiere weniger Testosteron, eine kleinere Prostata und weniger Rezeptoren (Shain u.a. ,1975). Wenn man ihnen Testosteron zuführt, verschwindet dieses Phänomen wieder. Ebenso erfolgt nach Kastrierung ein Abfall des Rezeptorgehaltes ; wenn man Testosteron substi - tuiert, steigt der Rezeptorgehalt wieder an. Es wurde jedoch von Lander (1983) festgestellt, daß während der Pubertät der Rezeptorgehalt mit der Konzentration von Prolactin korreliert, nicht mit der Serumkonzentration von Testosteron, LH oder FSH . Versuche, die in unserem Labor in Arbeit sind, manipulieren das Prolactin an kas- trierten Tieren.

Vorläufige Ergebnisse zeigen, daß ein hoher Prolac - tinwert im Serum mit hohem Rezeptorgehalt einher - geht und umgekehrt, wobei die Testosteronwerte immer niedrig sind.
So sprechen diese Versuche dafür, daß der Rezeptor - gehalt durch das Prolactin bestimmt wird.
Bei den Tieren, die in dieser Arbeit diskutiert werden, ist jedoch über das Prolactin nichts be - kannt. Dies sollte Anlaß zu weiteren Untersuchungen am kryptorchen Rattenstamm sein.
Da der Testosteronspiegel im Serum kryptorcher Tiere nach den Untersuchungen von Gärtner (1969) offen - sichtlich erniedrigt ist - er fand eine herabgesetzte 17 - Ketosteroidausscheidung - , Prostatagewicht und Androgenrezeptorgehalt in unseren Versuchen aber erhöht gefunden wurden, kann zusammenfassend festgestellt werden, daß eine unmittelbare Kontrolle des Rezeptorgehaltes durch das Testosteron unwahr- scheinlich ist.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob der Androgenrezeptorgehalt in der Prostata eines hereditär spontan unilateral kryptorchen Wistarrattenstammes im Vergleich zu einem gesunden Wistarrattenstamm verändert ist.
Die Prostaten junger, geschlechtsreifer , kryptorcher Tiere waren gegenüber den Prostaten normaler Tiere um den Faktor 1,53 vergrößert (p = 0,001) .
Die retinierten Hoden waren um den Faktor 0,5 kleiner (p = 0,001) , die deszendierten Hoden der kryptorchen Tiere um den Faktor 1,35 größer (p = 0,001) als die Hoden der Kontrolltiere.
Der Androgenrezeptorgehalt war bei den kryptorchen Tieren erhöht :
bezogen auf die ganze Prostata um den Faktor 3,25 (p = 0,001) ,
bezogen auf mg Prostata um den Faktor 2,1 (p=0,001),
bezogen auf mg Protein um den Faktor 2,0 (p = 0,001),
bezogen auf mg DNA um den Faktor 1,97 (p = 0,001) .
Der eutope Hoden war bei den unilateral kryptorchen Tieren hypertrophiert, doch ist die Androgenproduktion im atopisch gelegenen Hoden nach Literaturangaben erniedrigt. Trotzdem fanden wir größere Prostaten und eine höhere Androgenrezeptorkonzentration als bei den gesunden Tieren. Daher ist es unwahrschein - lich, daß Rezeptorkonzentration und Prostatagröße unmittelbar durch die Androgene reguliert werden.

Versuchs-nummer K:kryptorch N:normal	Zahl der Versuchs-tiere	Prostata-gewicht [mg]	Cytosol [ml]
1K	3	237	0,474
2N	3	162	0,324
5K	3	193	0,386
6N	3	109	0,218
9K	3	197	0,394
10N	3	101	0,202
13K	3	141	0,282
14N	3	115	0,230
17K	3	198	0,396
18N	3	119	0,238
19K	3	243	0,486
20N	3	120	0,240
23K	3	159	0,318
24N	3	118	0,236
27K	3	141	0,282
28N	3	115	0,230
31K	3	154	0,308
32N	3	105	0,210
33K	3	163	0,326
34N	3	127	0,256
$\bar{x}_K$		182,6	0,365
s_K		37,09	
$\bar{x}_N$		119,1	0,239
s_N		16,9	
p		0,001	

Insgesamt untersucht wurden 30 kryptorche Tiere (K) und 30 normale Tiere (N). Die Versuche wurden, wie oben aufgeführt, paarweise ausgeführt.

Versuchs-nummer K:kryptorch N:normal	lösl. Protein [mg/Prostata]	Protein/ mg Prostata [µg/mg]	DNA/ mg Prostata [µg/mg]
1K	2,94	12,40	2,962
2N	2,72	16,80	2,401
5K	2,32	12,02	2,399
6N	1,00	9,18	2,596
9K	3,54	17,96	3,000
10N	1,78	17,62	3,396
13K	1,80	12,76	2,397
14N	2,30	20,00	2,322
17K	2,46	12,42	3,722
18N	2,38	20,00	3,000
19K	3,02	12,42	2,798
20N	2,06	17,16	3,000
23K	2,04	12,84	2,717
24N	1,18	10,00	3,398
27K	1,58	11,20	3,199
28N	1,02	8,70	2,400
31K	1,84	11,94	3,390
32N	1,10	10,48	2,400
33K	2,54	15,58	3,202
34N	1,62	12,76	3,598
$\bar{x}_K$	2,41	13,15	3,029
s_K	0,62	2,04	0,498
$\bar{x}_N$	1,72	14,27	2,851
s_N	0,63	4,51	0,489
p	0,01	0,40	0,40

Insgesamt untersucht wurden 30 kryptorche Tiere(K) und 30 normale Tiere(N).Die Versuche wurden, wie oben aufgeführt, paarweise ausgeführt.

Versuchs-nummer K:kryptorch N:normal	DNA [mg/Prostata]	Rezeptor/ml Cytosol [fmol/ml]	Rezeptor/Prostata [fmol/ganze Prostata]
1K	0,702	384	182
2N	0,389	222	72
5K	0,463	562	216
6N	0,283	296	64
9K	0,591	368	144
10N	0,343	138	28
13K	0,338	260	74
14N	0,267	156	36
17K	0,737	274	108
18N	0,357	82	20
19K	0,680	380	184
20N	0,360	190	46
23K	0, 432	392	124
24N	0,401	102	24
27K	0,451	334	94
28N	0,276	246	56
31K	0,599	334	102
32N	0,252	214	44
33K	0,522	222	76
34N	0,457	36	10
$\bar{x}_K$	0,551		130,4
s_K	0,131		49,3
$\bar{x}_N$	0,398		40,0
s_N	0,067		20,1
p	0,001		0,001

Insgesamt untersucht wurden 30 kryptorche Tiere(K) und 30 normale Tiere (N). Die Versuche wurden, wie oben aufgeführt, paarweise durchgeführt.

Versuchs-nummer K:kryptorch N:normal	Rezeptor/ mg Prostata [fmol/mg]	Rezeptor/ mg Protein [fmol/mg]	Rezeptor/ mg DNA [fmol/mg]
1K	0,768	61,9	259
2N	0,444	26,4	185
5K	1,120	93,6	468
6N	0,588	64,3	228
9K	0,730	40,9	245
10N	0,278	15,7	81
13K	0,524	40,6	217
14N	0,314	15,6	134
17K	0,546	44,2	147
18N	0,164	8,2	55
19K	0,758	61,3	271
20N	0,384	22,1	127
23K	0,780	61,3	288
24N	0,204	20,4	60
27K	0,666	59,6	209
28N	0,486	55,9	205
31K	0,662	64,2	172
32N	0,420	41,2	134
33K	0,466	29,7	145
34N	0,078	5,6	20
$\bar{x}_K$	0,702	55,73	242,1
s_K	0,184	17,89	94
$\bar{x}_N$	0,336	27,54	122,9
s_N	0,158	19,89	69
p	0,001	0,001	0,001

Insgesamt untersucht wurden 30 kryptorche Tiere(K) und 30 normale Tiere (N). Die Versuche wurden, wie oben aufgeführt, paarweise ausgeführt.

Literatur

BIERICH, J. : Pathologie der endokrinen Organe
In: Feer, Lehrbuch der Kinderheilkunde ,
24. Aufl. , hrsg. von G.Joppich und F.J.Schulte.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1980

BONNE, Cl. and RAYNAUD, J.-P.:
Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors
Steroids 26 , (1975) , 227 - 232

BONNE,Cl. and RAYNAUD, J. -P. :
Assay of Androgen Binding Sites by Exchange with Methyltrienolone (R 1881)
Steroids 27 , (1976) , 497 - 507

BORN, H. - J. :
Testosteronbiosynthese in kryptorchen Testes von Ratten mit genetisch bedingter Deszensusstörung
Frankfurt a. Main, Dissertation (1976)

BURTON ,K. :
A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorinetic esti - mation of desoxyribonucleid acid
Biochem. J. 62 , (1956), 315 - 322

COLLISCHONN, G. :
Untersuchungen über die Testosteronbiosynthese in den Testes unilateral kryptorchider Ratten mit genetisch bedingter Deszensusstörung
Frankfurt a. Main , Dissertation , (1969)

DAVIES , P. , THOMAS, Ph. and GRIFFITHS ,K. :
Measurement of free and occupied cytoplasmic and nuclear androgen receptor sites in rat ventral prostate gland
J. Endocrinol. 74 , (1977) , 393 - 404

FIEDERER, B. :
Tübingen, Dissertation in Vorbereitung

FLAMME, A. :
Zur Genetik einer hereditär bedingten Ectopia testis bei Wistarratten
Hannover, Diplomarbeit, (1973)

GÄRTNER, K. :
Hereditärer Kryptorchismus bei Wistarratten
Z. Versuchstierkunde 11 , (1969), 179 - 189

GIANNOPOULOS, G. , GOLDBERG, P. , SHEA, Th. , TULCHINSKI, D. :
Unoccupied and Occupied Estrogen Receptors in Myometrial Cytosol and Nuclei from Nonpregnant and Pregnant Women
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51 ,(1980), 702 -709

HELLBACH , G. :
Histometrische Untersuchungen an Testes von Ratten mit hereditär bedingter unilateraler Deszensusstörung
Hanau a. Main , Dissertation, (1970)

KATZENELLENBOGEN , A.,JOHNSON,H., CARLSON,K. :
Studies of the Uterine, Cytoplasmic Estrogen Binding Protein. Thermal Stability and Ligand Dissociation Rate. An Assay of Empty and Filled Sites by Exchange.
J. Steroid Biochem. 12 , (1973) , 4092 - 4099

KRAUSE , H.-H. :
Qualitative und quantitative Untersuchungen an spontan dystopen Rattenhoden
Frankfurt a. Main, Dissertation , (1971)

LANDER, K. :
Konzentration des cytoplasmatischen Androgen - rezeptors in der Prostata der Ratte während der Pubertät
Tübingen, Dissertation, (1983)

MAINWARING, W. I. P. :
The Mechanism of Action of Androgens
New York , (1977), 57 -73

MOELLER, H. :
Bestimmung von Androgenrezeptoren durch Bindung von [^{3}H]- Dihydrotestosteron in Gegenwart von NAD^+ - Nukleosidase. Anwendung auf Rattenprostata während der Pubertätsentwicklung und auf TUR - Späne von menschlicher Prostata.
Tübingen, Attempto - Verlag (1982)

MOELLER , H. , OETTLING, G. , FIEDERER, B. ,
BRÜGMANN, G. :
A quantative assay for the cytoplasmic androgen receptor using [^{3}H] - dihydrotestosterone in the presence of NAD^+- nucleosidase
Acta Endocrinol . 102 , (1983) , 153 -160

MOELLER, H., OETTLING, G. , FIEDERER,B. and
GUPTA, D. :
Receptor Estimation through [^{3}H]- 5α-Dihydro - testosterone Exchange
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18 , (1980), 726

ODENTHAL, K. P. :
Untersuchungen zur Entwicklung einer hereditär bedingten Ectopia testis bei der Wistarratte
Hannover, Dissertation, (1972)

OETTLING, G.
Tübingen, Dissertation in Vorbereitung

SACHS, L. :
Angewandte Statistik
Springer, Berlin, Heidelberg, New York,(1974),212

SCHAFFNER, W. und WEISSMAN, C. :
A Rapid, Sensitive and Specific Method for the Determination of Protein in Dilute Solution
Anal. Biochem. 56 ,(1973), 502 - 514

SHAIN,S.A. and BOESEL,R. :
Saturation analysis of the binding of androgens, antiandrogens and estrogens by the cytoplasmic high affinity androgen receptor of the rat ventral prostate
J. Steroid Biochem. 6 , (1975) , 43 - 50

SHAIN, S. , BOESEL , R. , LAMM,D. , RADWIN,H.:
Characterization of unoccupied and occupied androgen binding components of the hyperplastic human prostate
Steroids 31 , (1978) , 541 - 556

SNOCHOWSKI, M. , POUSETTE, A. , EKMAN, P.,BRESSION,D.
ANDERSSON, L. , HÖGBERG, B. , GUSTAFSSON, J. :
Characterization and Measurement of the Androgen Receptor in Human Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Carcinoma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45 , (1977),920 -930

WAGNER, R.K. :
Characterization and assay of steroid hormone receptors and steroid binding serum proteins by agar gel electrophoresis at low temperature
Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 353,(1972), 1235 - 1245

WELCH , B. L. :
The significance of the difference between two means when the population variances are unequal
Biometrika 29, (1937), 350 - 361

WOOSLEY , J. and MULDON, Th. :
The thermolability of rat uterine cytosol estrogen receptors : Basis for a novel cytosol exchange - denaturation - assay
J. Steroid Biochem. 11 , (1979) , 1065 - 1071

Lebenslauf (tabellarischer Überblick)

Karin Regine Hubich

14.11.1959	In Reutlingen als Tochter des Bauingenieurs Georg Hubich und seiner Ehefrau Lieselotte , geb. Gierke , geboren
1966 - 1969	Besuch der Römerschanz - Grundschule in Reutlingen
1969 - 1978	Besuch des Friedrich - List - Gymnasiums in Reutlingen
Mai 1978	Schulabschluß und Erhalt der allgemeinen Hochschulreife (Durchschnittsnote : 1,0) ; vorläufige Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
seit WS 1978 /79	Medizinstudium in Tübingen
26. 8. 1980	Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
September 1980	Endgültige Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
27. 8. 1981	Ablegen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
November 1981	Beginn der Doktorarbeit

Oktober 1982 bis Juli 1983	Studienaufenthalt in Glasgow
20. 3. 1984	Ablegen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
23. 4. 1985	Bestehen des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
26. 4. 1985	Approbation als Arzt
seit 1. 5. 1985	Ausbildung an der Universitäts-Augenklinik Würzburg zum Facharzt für Augenheilkunde